

6种药物对抗索曼中毒性肌病的作用

袁本利、许小珊 (军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

提要 大鼠膈肌局部索曼(soman)中毒, 15 min后膈肌运动终板区发生肌病。终板区肌纤维的局灶性破坏, 即肌浆网和线粒体的扩张以及肌丝的解体等。中毒后立即给予HI-6或中毒前新霉素伍用加拉碘铵可以完全对抗肌病。双复磷, 密胆碱和硫酸镁均可明显降低肌病发生率。终板区肌纤维的 Ca^{2+} 着色率与肌病发生率呈正相关。

关键词 索曼; 肌病; HI-6 [2-羟基-亚氨基-甲基]-吡啶鎓-(1)-甲基]-[4-氨基甲酰)-吡啶鎓-(1)-甲基]-二氯醚; 新霉素; 加拉碘铵; 半胆碱3; 硫酸镁; 钙; 双复磷

索曼是一种较强的胆碱酯酶(ChE)抑制剂, 它在抑制机体ChE, 引起严重功能紊乱的同时, 也能造成骨骼肌运动终板区的损伤(即

肌病)⁽¹⁾。其它ChE抑制剂也可引起肌病。文献采用电镜和组化技术进行形态观察, 并且探讨了发生肌病的原因⁽²⁻⁴⁾。我们采用病理组织学和组织化学技术观察了此种肌病的形态特点, 最早发生时间和发生率, 并重点探讨了作用于神经肌接头(NMJ)不同环节药物对抗肌病的效果。

材 料 和 方 法

大鼠, ♀, 体重 $209 \pm SD 13$ g, im戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉, 沿腹白线剪开腹壁, 进行膈肌局部索曼中毒。将 15×7.5 mm²的棉纸贴附在左膈神经腹侧分支区的膈肌腹侧面, 同时将2 μ g/10 μ l索曼滴在棉纸上, 用稍大的

锡纸分隔棉纸与内脏的接触⁽⁵⁾。正常对照用等量的生理盐水代替索曼。中毒时间一律从膈肌开始染毒时算。超过 30 min 的中毒大鼠,在中毒 30 min 时将棉纸和锡纸取出,关闭腹腔,分别于中毒后 15 min 至 d 7 活杀大鼠,取中毒膈肌镜检。

采用常规 Harris 苏木精染色方法处理中毒区膈肌的冰冻切片。根据光镜下终板区受损肌纤维占被观察肌纤维的%计算肌病发生率。每只大鼠观察 4 张切片,每张切片约有 70-100 根肌纤维。中毒前后不同时间给予某种药物,中毒 1 h 活杀大鼠,将该组肌病发生率与中毒对照组的肌病发生率进行 χ^2 检验,判断该药对抗肌病的强弱。

观察 Ca^{2+} 着色采用茜素红染色方法⁽⁶⁾。根据光镜下终板区出现红色斑点的肌纤维占被观察肌纤维的%计算 Ca^{2+} 着色率。

乙酰胆碱酯酶(AChE)组化染色采用直接染色法⁽⁷⁾。

电镜标本用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定,用梯度酒精脱水, Epon 812 包埋, LKB 超薄切片机切片,片厚约 50 nm, 枸橼酸铅加醋酸铀复染,用 Philips 400-T 电子显微镜观察。

索曼,本所合成。新霉素,上海信谊药厂生产,每片 0.1 g,磨碎成粉,用蒸馏水溶解后过滤,单药时 200 mg/kg,伍用时 100 mg/kg,中毒前 1 h 时 im。加拉碘铵(gallamine triethiodide),法国 Specia 公司出品,40 mg/2 ml,10 mg/kg 于中毒前 15 min 时 im。HI-6 (bispyridinium oxime, [(2-羟基-亚氨基)-吡啶鎓-(1)-甲基]-[(4-氨基甲酰)-吡啶鎓-(1)-甲基]-二氯醚)本所合成,10 mg/kg 于中毒后立即或 30 min 时 im。双复磷(obidoxime),本所合成,10 mg/kg 于中毒后立即 im。密胆碱(hemicholine),美国 Sigma 化学公司生产,0.2 mg/kg 于中毒前 2 h 时 im。硫酸镁,北京制药厂生产的 10% 注射液,40 mg/kg 尾静脉缓慢注入后立即中毒。

结果和讨论

肌病的形态特点

1. 中毒 15 min 肌纤维终板部位出现一条状苏木精淡染区,它与肌纤维走向垂直,淡染区的两端肌膜完整,该肌纤维局部略肿胀。电镜下观察到轴突末梢囊泡增多,突触后线粒体肿胀,肌浆网扩张,近终板处的 Z 线扭曲或消失(图 1-A, 见图版 1)。

2. 中毒 1 h 条状的苏木精淡染区扩大,其两端肌膜不完整,其两侧浓染物质增多,该部位明显肿胀。电镜下观察到轴突末梢内囊泡大量增多。突触前后膜局部缺损,皱襞结构紊乱(图 1-B),突触后线粒体明显肿胀,肌浆网高度扩张,肌丝解体。

3. 中毒 5 d 受损肌纤维中心区域出现再生的卵圆形肌细胞核,可见核仁,有的为双核仁。核染色质基本正常。在核旁见疏密不均的肌丝和断续排列的 Z 线。

本文观察到的索曼中毒性肌病的形态改变与文献报道的其它 ChE 抑制剂引起骨骼肌的形态改变并无大的差别。Laskowski 等观察到这种特殊肌病的明显形态改变是在中毒后 30 min⁽³⁾。我们膈肌局部中毒,于中毒 15 min 就观察到了膈肌的这种改变,其中的时间差异可能是中毒方式不一样、毒剂作用于骨骼肌快慢不同的缘故。

肌病发生率及药物和其它因素对肌病的影响

1. 肌病的发生率和 Ca^{2+} 着色率(表 1)
索曼中毒后 15 min,肌病发生率是 14%, Ca^{2+} 着色率是 63%。中毒后 30 min 和 1 h,肌病发生率分别为 24% 和 26%(图 1-D), Ca^{2+} 着色率分别为 60% 和 55%(图 1-F)。中毒后 1 d 和 3 d,肌病发生率仍较高,分别为 21% 和 23%。中毒后 5 d 和 7 d,分别有 12% 和 4% 的肌纤维未恢复正常。这种肌病的恢复过程与形态观察的结果相吻合。终板 AChE 活性的再生在时间上也与肌病的修复时间相一致,

Tab 1. Incidence of myopathy and Ca^{2+} dyeing at the area of motor end plates in rat diaphragm 15 min to 7 d after local poisoning by soman ($2 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$). $n=6$. $\bar{x} \pm \text{SD}$ * $p>0.05$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$ vs 60 min group.

Time	Myopathy (%)	Ca^{2+} dyeing (%)	AChE(5) activity
Saline	0	0	strong
15 min	$14 \pm 2^{**}$	$63 \pm 9^*$	—
30 min	$24 \pm 8^*$	$60 \pm 11^*$	—
60 min	26 ± 8	55 ± 13	—
1 d	$21 \pm 3^*$	—	—
3 d	$23 \pm 6^*$	—	—
5 d	$12 \pm 4^{**}$	—	medium
7 d	$4 \pm 1^{***}$	—	strong

与我们过去的工作⁽⁵⁾所提出 NMJ 功能的恢复时间相一致。

2. 药物对终板 AChE 活性、肌病和 Ca^{2+} 着色的影响 从表 2 可以看出, 新霉素, 加拉碘铵, HI-6, 双复磷, 密胆碱和硫酸镁均对肌病和 Ca^{2+} 着色有对抗作用。其中以新霉素伍用加拉碘铵和中毒后立即 im HI-6 的效果最好, 可以免除肌病的发生和 Ca^{2+} 着色。计算各组的肌病发生率和 Ca^{2+} 着色率的相关性

表明, 二者呈现正相关, $r=0.90$ 。

新霉素对 NMJ 有阻断作用⁽⁸⁾, 主要是通过干扰突触前乙酰胆碱(ACh)释放⁽⁹⁾。三碘季胺酚是竞争型肌松剂, 主要是阻断乙酰胆碱受体(AChR)被 ACh 作用而达到肌松效果⁽¹⁰⁾。这两种药物伍用几乎完全对抗索曼引起的膈肌收缩抑制⁽¹¹⁾。HI-6 和双复磷 分别是双吡啶单肟和双吡啶双肟类 ChE 重活化剂, 可使 NMJ 被抑制的 AChE 得到部分恢复。密胆碱可以干扰突触前 ACh 的合成和转运⁽¹²⁾。 Mg^{2+} 在 NMJ 与 Ca^{2+} 互为拮抗剂, Ca^{2+} 参与了 ACh 的释放⁽¹³⁾和肌收缩的去抑制过程。以上药物有效地减低肌病发生率说明终板区 AChE 被抑制、ACh 大量增多是肌病发生的主要原因; AChR 被 ACh 持续作用是发生肌病的重要环节; Ca^{2+} 在肌病发生的过程中是激动剂。

3. 切断膈神经对肌病的影响 中毒前 24 h 截除颈段膈神经 2 mm, 可以避免中毒区膈肌发生肌病和 Ca^{2+} 着色。这个结果说明发生肌病的骨骼肌必须在支配它的运动神经功能完好的情况下才能被索曼作用而引起损伤。也可以说, 索曼中毒后引起的肌病不是索曼直接

Tab 2. Effects of 6 drugs (MgSO_4 iv, other drugs im) on AChE activity, myopathy and Ca^{2+} dyeing at the area of motor end plates in rat diaphragm locally poisoned by soman ($2 \mu\text{g}/10 \mu\text{l}$), examined 1 h after poisoning. $n=6$, $\bar{x} \pm \text{SD}$. * $p>0.05$, ** $p<0.05$, *** $p<0.01$ vs soman group.

Drugs	Dose (mg/kg)	Time (min)	AChE activity	Myopathy (%)	Ca^{2+} dyeing (%)
Saline			strong	0	0
Soman			—	26 ± 8	55 ± 13
Soman + neomycin	200	-60	—	$10 \pm 6^{***}$	$15 \pm 10^{***}$
Soman + gallamine	10	-15	—	$14 \pm 7^{**}$	$32 \pm 10^{**}$
Soman + {neomycin gallamine}	{100 10}	{-60 -15}	—	0^{***}	0^{***}
Soman + HI-6	10	0	medium	0^{***}	0^{***}
Soman + HI-6	10	+30	slight	$9 \pm 4^{***}$	$44 \pm 8^*$
Soman + obidoxime	10	0	slight	$14 \pm 6^{**}$	$31 \pm 8^{**}$
Soman + hemicholine	0.2	-120	—	$13 \pm 4^{**}$	—
Soman + MgSO_4	40	-2	—	$12 \pm 2^{**}$	—

HI-6: bispyridinium oxime, [(2-hydroxy-iminomethyl)-pyridinium-(1)-methyl]-[(4-carbamoyl)-pyridinium-(1)-methyl]-ether dichloride

对肌组织本身造成的损害。

4. 氨甲酰胆碱对肌病的影响 用索曼常规中毒剂量的 1/100, 即 20 ng/10 μ l 膈肌局部中毒, 中毒 1 h 活杀大鼠, 肌病发生率是 14%。若在中毒 30 min 时 im 氨甲酰胆碱 0.2 mg/kg, 肌病发生率为 25%。两组比较相差显著。氨甲酰胆碱是作用于 AChR 却不被 AChE 水解的药物, 它促使肌病发生率明显增加说明能够兴奋 AChR 的药物也可以引起这种肌病⁽¹⁴⁾。

本文在药物对抗肌病方面, 首先应用新霉素, 新霉素伍用加拉碘铵以及 HI-6, 并观察到新霉素伍用加拉碘铵和 HI-6 可完全对抗索曼引起的肌病, 同时也比较了其它几种药物。这些结果提示我们, 作用不同环节的药物伍用或及时给予较强的 ChE 重活化剂在对抗索曼引起的肌病上可收到很好的效果。本实验用膈肌局部中毒方法首先在中毒 15 min 观察到肌病的发生。在发生机制方面, 支持了堆积的 ACh 持续作用 AChR 并在 Ca^{2+} 参与下使肌纤维终板区受损的理论。

致谢 杨怡同志完成电镜制片

参 考 文 献

- 1 Preusser HJ. Die Ultrastruktur der motorischen Endplatte im Zwerchfell der Ratte und veränderungen nach Inhibierung der Acetylcholinesterase. *Z Zellforsch* 1967; 80 : 436
- 2 Ariëns AT, Meeter E, Wolthuis OL, van Benthem RMJ. Reversible necrosis at the end-plates region in striated muscles of the rat poisoned with cholinesterase inhibitors. *Experientia* 1969; 25 : 57
- 3 Laskowski MB, Olson WH, Dettbarn WD.

- Initial ultrastructural abnormalities at the motor end plate produced by a cholinesterase inhibitor. *Exp Neurol* 1977; 57 : 13
- 4 Salpeter MM, Kasprzak H, Feng H, Fertuck H. Endplates after esterase inactivation *in vivo*: correlation between esterase concentration, functional response and fine structure. *J Neurocytol* 1979; 8 : 95
- 5 许小珊、沈菊英. 索曼中毒运动终板乙酰胆碱酯酶活性和接头传递功能的关系. *生理学报* 1983; 35 : 101
- 6 McGee-Russel SM. Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem* 1958; 6 : 22
- 7 Karnovsky MJ, Roots L. A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase. *J Histochem Cytochem* 1964; 12 : 219
- 8 Timmerman JC, Long JP, Pittinger CB. Neuromuscular blocking properties of various antibiotic agents. *Toxicol Appl Pharmacol* 1959; 1 : 299
- 9 Brazil OV, Prado-Franceschi J. The nature of neuromuscular block produced by neomycin and gentamycin. *Arch Int Pharmacodyn* 1969; 179 : 78
- 10 Taylor P. Neuromuscular blocking agents. In: Goodman LS, Gilman A, eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. 6th ed. London: Macmillan. 1980 : 223-4
- 11 于山平、刘传缙. 非去极化肌松剂和氨基甙类抗生素对抗索曼引起的大鼠膈肌接头阻滞. *中国药理学报* 1985; 6 : 11
- 12 MacIntosh FC, Birks RI, Sastry PB. Pharmacological inhibition of acetylcholine synthesis. *Nature* 1956; 178 : 1181
- 13 Castillo J, Engbaek L. The nature of the neuromuscular block produced by magnesium. *J Physiol (Lond)* 1954; 124 : 370
- 14 Fenichel GM, Dettbarn W-D, Newman TM. An experimental myopathy secondary to excessive acetylcholine release. *Neurology* 1974; 24 : 41

Acta Pharmacologica Sinica 1988 Mar; 9 (2) : 111-115

Antagonistic effects of 6 drugs on myopathy induced by soman intoxication

YUAN Ben-Li, XU Xiao-Shan

(Institute of Pharmacology & Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

ABSTRACT When the diaphragm of rat intoxicated by soman (2 µg/10 µl) locally, myopathy developed at the area of motor end plates 15 min after poisoning. The characteristics of morphological changes were focal degeneration and necrosis of muscular fibres at the motor end plates, involving swelling of mitochondria, dilation of sarcoplasmic reticulum and disappearance of Z lines, etc. The myopathy was completely controlled by im HI-6 (bispyridinium oxime, 10 mg/kg) immediately after soman poisoning or by pretreatment of im neomycin (100 mg/kg, -60 min) combined with im gallamine triethiodide (10 mg/kg, -15 min).

Obidoxime im (10 mg/kg, 0 min), hemicholine im (0.2 mg/kg, -120 min) or iv MgSO₄ (40 mg/kg, -2 min) decreased the incidence of myopathy. At the motor end plates the rate of positive Ca²⁺ dyeing was correlated with the incidence of myopathy, $r = 0.90$.

KEY WORDS soman; muscular disease; bispyridinium oxime [(2-hydroxy-imino-methyl)-pyridinium-(1)-methyl]-[4-carbamoyl]-pyridinium-(1)-methyl]-ether dichloride (HI-6); neomycin; gallamine triethiodide; hemicholinium 3; magnesium sulfate; calcium; obidoxime oxime

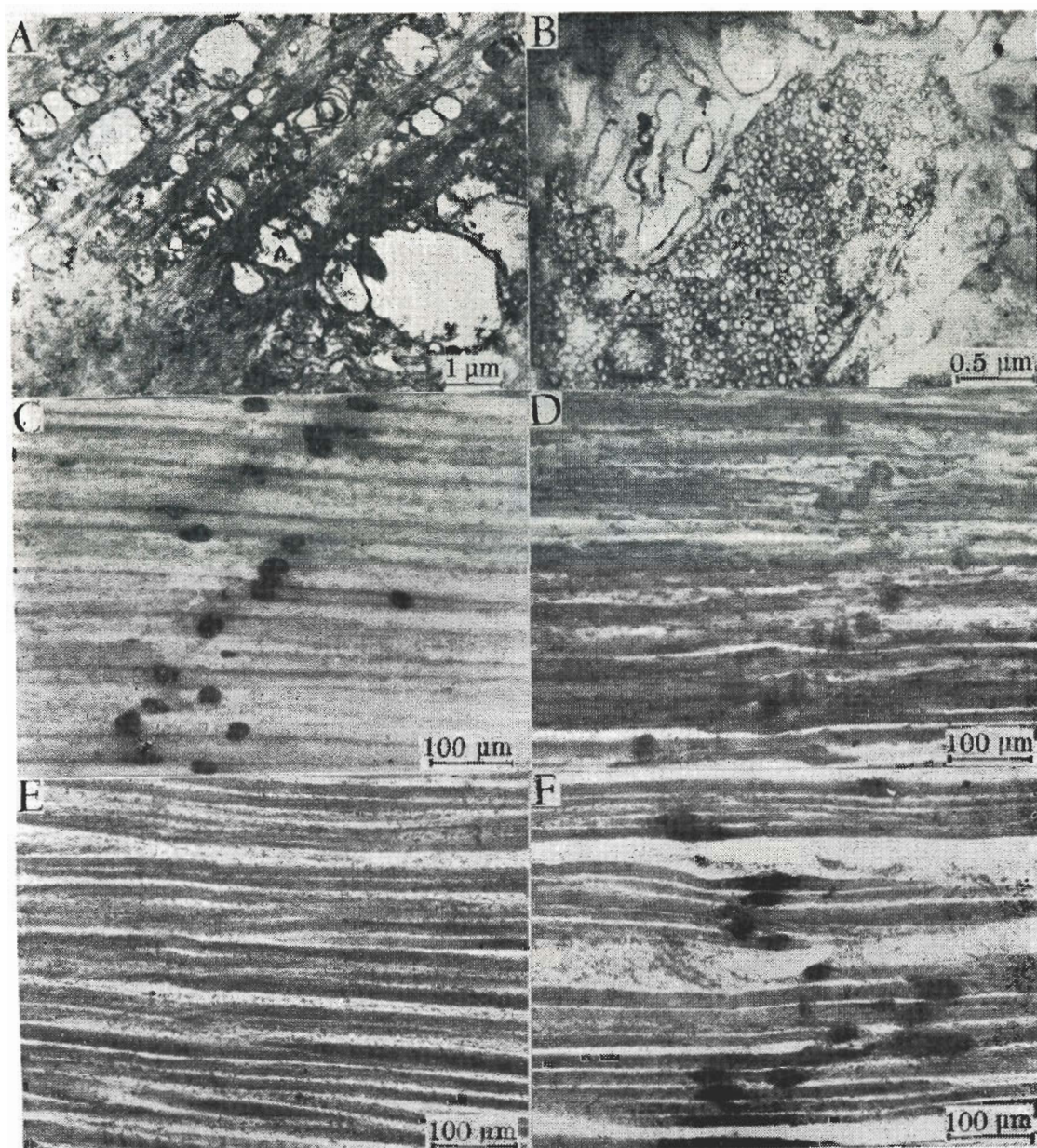


Fig 1. Rat diaphragm after local poisoning by soman (2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$). (A) After 15 min, swelling of mitochondria, dilation of sarcoplasmic reticulum, disintegration of myofibrils and distortion or disappearance of Z lines at the subsynaptic region. $\times 13\,000$. (B) After 1 h, great increase of the number of vesicles in the nerve ending. $\times 36\,000$. (C) AChE activity at the motor end plates of normal rat diaphragm. $\times 200$. (D) After 1 h, complete inhibition of AChE activity and myopathy appearance at the motor end plates. AChE histochemistry combined with Harris hematoxylin stain. $\times 200$. (E) No Ca^{2+} accumulation at the motor end plates in normal rat diaphragm. $\times 200$. (F) After 1 h, obvious accumulation of Ca^{2+} at the motor end plates, Alizarin red stain, $\times 200$. See p 112